

TẠO DÒNG CÀ CHUA PT18 KHÁNG BỆNH XOĂN VÀNG LÁ DO VIRUS BẰNG KỸ THUẬT RNAi

Nguyễn Thị Hải Yến^{1,2}, Phạm Thị Vân², Chu Hoàng Hà², Chu Hoàng Mậu¹, Lê Trần Bình²

¹Đại học Thái Nguyên

²Viện Công nghệ sinh học

TÓM TẮT

Hiện nay, công nghệ RNAi trong việc tạo cây trồng kháng virus đang là hướng nghiên cứu khả quan và nhận được sự quan tâm của nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới. Trong nghiên cứu này, cấu trúc RNAi/pGWTLVCV-C₁,+CP₂ mang hai đoạn gen CP và C1 của Tomato Yellow Leaf Curl Viet Nam Virus (TYLCVV) đã được sử dụng để chuyển vào cà chua giống PT18 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong các dòng cà chua tái sinh có khả năng kháng kanamycin (Km) cho 21/23 dòng dương tính bằng phản ứng PCR. Sử dụng 2 phương pháp lấy nhiễm virus gồm thông qua nguồn bộ phận tự nhiên và qua vết thương bằng ghép áp với cây bệnh để đánh giá tính kháng TYLCVV cho 21 dòng cà chua T0 chuyển gen mang cấu trúc RNAi/pGWTLVCV-C₁,+CP₂. Kết quả cho thấy tỉ lệ cây kháng hoàn toàn với virus TYLCVV gây bệnh xoắn lá cà chua là 4/21 dòng chiếm 19%. Xác định sự phân li của gen chuyển ở thế hệ T1 trong các dòng này bằng chỉ thị kháng kháng sinh Km. Hai dòng LCP1-4 và LCP1-16 cho kết quả phân li gen theo tỷ lệ 3:1 (3 cây mang gen : 1 cây không mang gen). Kết quả phân tích tính kháng virus của dòng LCP1-4 thế hệ T1 cho thấy tỷ lệ kháng hoàn toàn với TYLCVV là 17/43 cây chiếm 39%.

Từ khóa: cà chua PT18, chuyển gen, RNA interference, Tomato Yellow Leaf Curl Viet Nam Virus

MỞ ĐẦU

Virus xoắn vàng lá cà chua Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) là nguyên nhân gây bệnh xoắn vàng lá trên nhiều đối tượng cây trồng họ cà như cà chua, thuốc lá, khoai tây...lây nhiễm hại nghiêm trọng đến năng suất, chất lượng cây trồng. Năng suất thiệt hại trung bình từ 55 - 90% thậm chí là 100% khi cây bị nhiễm bệnh này (Reynaud *et al.*, 2003). Vì vậy, việc nghiên cứu tạo cây trồng có khả năng kháng lại những chủng virus này là rất có ý nghĩa đối với việc cải thiện năng suất và chất lượng giống cây.

TYLCV thuộc chi *Begomovirus*, họ Geminiviridae được phát hiện lần đầu tiên ở Israel vào năm 1939 (Pico *et al.*, 1996). Các virus trong chi *Begomovirus* được chia làm 3 nhóm chính dựa vào cấu trúc genome của chúng bao gồm loại hai vòng gen - thể dipartite, loại một vòng gen nhưng dịch mã thành hai khung đọc riêng biệt - thể monopartite và loại một vòng gen kèm DNA vệ tinh (Chowda *et al.*, 2005; Idris, Brown, 2006; Ha *et al.*, 2008). Genome của TYLCV gồm 6 gen chức năng đó là các gen V1 (CP), V2 (pCP), C1, C2, C3, C4. Các gen trong hệ gen của TYLCV có thể nằm trên cùng một vòng DNA-A hoặc hai vòng DNA-A và DNA-B riêng biệt tùy chủng virus và ngăn cách với nhau bởi một vùng liên gen khoảng 150 - 250 nucleotide.

TYLCV được lan truyền nhờ loài bộ phận *Bemisia tabaci*, đây là loài côn trùng có sức sinh sản nhanh và mạnh, đại dịch do sự bùng phát số lượng của chúng gây ra đã được ghi nhận. Bên cạnh các biện pháp kiểm soát như phun thuốc trừ côn trùng, tìm kiếm nguồn gen kháng virus tự nhiên, chuyển gen có nguồn gốc virus gây bệnh, thì hiện nay RNAi là cơ chế gây bất hoạt gen mới đang được chú ý nghiên cứu ứng dụng (Herr, 2005). RNAi được khởi đầu bằng việc phân cắt phân tử RNA chuỗi kép (dsRNA) bởi enzyme Dicer tạo thành các phân tử siRNA ức chế nhỏ có kích thước khoảng 21-26 nucleotide (Bernstein *et al.*, 2001; Hamilton, Baucombe, 1999; Meister, Tuschl, 2004). Sau đó, các siRNA này được giải xoắn và một mạch gắn kết với một phức hợp protein (RISC) một cách chọn lọc tạo thành phức hợp cảm ứng sự bất hoạt RNA. Sau khi nhận dạng mRNA đích qua việc bắt cặp các base tương đồng với trình tự của sợi đơn siRNA trong RISC, mRNA đích bị phân cắt nhờ một endonuclease và làm bất hoạt gen (Hammond *et al.*, 2000; Tabara *et al.*, 2002). Ở thực vật, RNAi có thể được thực hiện bằng cách chuyển gen có cấu trúc biểu hiện sự phiên mã cao RNA sense, anti-sense hoặc RNA kép tổ chức chính nó mà chứa trình tự tương đồng với gen đích như gen của virus gây bệnh... (Smith *et al.*, 2000; Helliwell, Waterhouse, 2003).

Trong hệ gen của *Begomovirus*, gen CP mã hóa protein vỏ (coat protein) tham gia cấu tạo capsid và gen CI mã hóa protein sao chép (Rep-protein) là những gen có chức năng quan trọng trong quá trình nhân lên của virus, mặt khác còn được xem là những vùng gen có độ bảo thủ cao nên thường được lựa chọn làm nguyên liệu trong việc thiết kế vector chuyển gen tạo cây kháng virus gây bệnh ở thực vật (Zrachya et al., 2007; Kamachi et al., 2007). Trong bài báo này, chúng tôi công bố kết quả chuyển cấu trúc vector RNAi có dạng RNA kẹp tóc tự bổ sung mang intron (intron-hairpin RNA, ihpRNA) nằm giữa hai đoạn gen $C_{1,2}+CP_2$ (sản phẩm ghép nối gen CI và CP của TYLCVV) dưới sự điều khiển của promoter CaMV35S vào giống cà chua PT18. Kết quả đánh giá tính kháng bệnh của các dòng cà chua chuyển gen thể hệ T0 và T1 thông qua lấy nhiễm virus TYLCVV sẽ được trình bày dưới đây.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu thực vật

Hạt giống cà chua PT18 do Viện Rau quả, Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

Chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang cấu trúc RNAi/pGWTLVCV- $C_{1,2}+CP_2$ do Nguyễn Thị Hải Yến và cộng sự thiết kế (Nguyễn Thị Hải Yến et al., 2010).

Phương pháp nghiên cứu

Chuyển cấu trúc RNAi/pGWTLVCV- $C_{1,2}+CP_2$ vào cà chua PT18

Để chuyển cấu trúc RNAi vào giống cà chua PT18, chúng tôi tham khảo quy trình chuyển gen của Đỗ Xuân Đồng và đồng tác giả (Đỗ Xuân Đồng et al., 2007)

Tạo dịch huyền phù vi khuẩn

Một ngày trước khi biến nạp, tiến hành nuôi cấy một khuẩn lạc vi khuẩn *A. tumefaciens* C58 pGV2260 mang cấu trúc RNAi/pGWTLVCV- $C_{1,2}+CP_2$ trong 3 ml môi trường LB lỏng bổ sung streptomycin 40mg/l, spectinomycin 100 mg/l và rifamycin 50 mg/l trong khoảng thời gian 7 - 8 h ở 28°C với tốc độ 200v/phút. Sau đó hút 1 ml dịch khuẩn vừa nuôi sang 15 ml LB bổ sung kháng sinh như trên, tiến hành nuôi lắc qua đêm cho đến khi $OD_{660} = 0,7 - 1,0$. Tiếp theo, hút 4 - 5 ml dịch khuẩn

trộn vào 30 ml LB lỏng không bổ sung kháng sinh, nuôi lắc đến $OD_{660} = 0,7 - 1,0$. Dịch khuẩn được ly tâm 6000v/p trong 10 phút để thu tế bào vi khuẩn. Các khuẩn được hòa trong dung dịch 1/2 MS ($OD_{660} = 0,5 - 0,7$)

Chăm sóc vật liệu và biến nạp

Hạt cà chua PT18 sau khi được khử trùng bằng cồn 70% và dung dịch javen 30% được thẩm khô và cho nảy mầm trên môi trường MS trong khoảng thời gian 7 - 10 ngày. Sự dụng dao sắc cắt hai đầu các lá mầm để gây tổn thương. Sau đó ngâm vào dịch huyền phù vi khuẩn trên trong khoảng thời gian 30 phút. Tiếp đó, các mảnh lá mầm được thẩm khô và chuyển lên môi trường đồng nuôi cây (MS (I-V) bổ sung 2mg/l BAP, 2mg/l NAA, 30 g/l sucrose và 7,5g agar, pH = 5,8). Sau 2 ngày, các mảnh lá được chuyển lên môi trường tái sinh (môi trường C: MS (I + V) bổ sung 2 mg/l zeatin, 30% sucrose và 7,5g agar, pH = 5,8) với kháng sinh diệt khuẩn cefotaxim 500 mg/l và kháng sinh chọn lọc kanamycin 50 mg/l. Sau 3 - 4 tuần, các chồi hình thành được cắt chuyển sang môi trường ra rễ (Môi trường B: MS (I-V) bổ sung 0,3 mg/l IBA, 15 g/l sucrose và 7,5 g agar, pH = 5,8) có bổ sung cefotaxim 250 mg/l và kanamycin 50 mg/l. Những cây ra rễ trên môi trường chọn lọc sẽ được nhân vô tính trên môi trường MS (I-V) bổ sung 1 mg/l zeatin, 30% sucrose và 7,5 g agar với pH = 5,8 để đảm bảo số lượng nhiều cây cùng dòng phục vụ cho việc đánh giá tính kháng virus của các dòng cây chuyển gen. Các cây con thể hệ T0 sau 2 tuần trên môi trường ra rễ sẽ được trồng ra bầu bầu: cát = 1 : 1 hoặc bầu đất và chăm sóc đặc biệt trong 7 - 10 ngày sau đó chuyển sang bầu đất lớn hoặc đem trồng trong vườn thí nghiệm.

Đánh giá các dòng cà chua chuyển gen

PCR kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong các dòng cà chua chuyển gen

Thu lá cà chua ở giai đoạn cây trồng trong vườn thí nghiệm sau 3 tuần. Tách chiết DNA tổng số theo phương pháp dùng CTAB (Collins, Symons, 1992) có các tiền chất phù hợp với điều kiện thí nghiệm tại Việt Nam. Mẫu lá cà chua được nghiền nhanh trong mortar lạnh, bổ sung đệm tách và ủ 65°C trong 2 h. Dùng phenol:chloroform:isoamylalcohol (25:24:1) để loại bỏ tạp chất và dùng isopropanol để tủa DNA. Gen đặc hiệu được khuếch đại với cặp mồi dùng trong thiết kế vector chuyển gen (Nguyễn Hải Yến et al., 2010). Thành phần phản ứng PCR bao gồm 12 µl H₂O, 2 µl đệm 10x, 2 µl MgCl₂ 25 mM, 1,6 µl dNTPs 2,5 mM; 0,8 µl mỗi 10 pmol mỗi loại, 3 µl

DNA tổng số và 0,4 μ l Taq DNA polymerase 1u/ μ l. Phản ứng được tiến hành trong máy PCR với chu trình nhiệt bao gồm các bước: 94°C/5 phút; 30 chu kỳ (94°C/1 phút; 52°C/1 phút; 72°C/1 phút); kết thúc ở 72°C/10 phút.

Đánh giá tính kháng TYLCVV thông qua lấy nhiễm nguồn bộ phận tự nhiên

Tiến hành trồng các dòng cà chua chuyển cấu trúc gen RNAi/pGWTLGV-C_{1,2}+CP₂ (ký hiệu là LCPI) và đối chứng (WT - cà chua PT18 không chuyển gen) trong vườn thí nghiệm có áp lực bệnh cao với sự có mặt đồng dao cá thể của quần thể bộ phận bên cạnh những cây cà chua WT đã nhiễm bệnh. Bố trí trồng cây theo hàng trong đó cây WT đã bị bệnh mức độ S2 đến S4 trồng ở hàng giữa và các dòng cây chuyển gen và đối chứng trồng hai hàng 2 bên với khoảng cách là 40 cm. Xác định sự có mặt của bộ phận thông qua quan sát và đếm số lượng bộ phận có mặt trên cây sau khoảng thời gian 3 ngày một lần vào cùng khoảng thời điểm trong ngày. Mỗi dòng cà chua chuyển gen theo dõi ít nhất 5 cây.

Đánh giá tính kháng bằng phương pháp ghép áp cây lành với cây mang bệnh

Trồng các dòng cây cần kiểm tra vào chậu thí nghiệm và tiến hành ghép sau khi cây đạt chiều cao khoảng 30 - 35 cm. Dùng dao lam sắc cắt vát một miếng nhỏ (dài 1,5 - 2 cm rộng 0,4 - 0,5 cm) vừa chạm vào lớp gỗ của cây ở vị trí gần ngọn chỗ cành non của cây. Dùng dây buộc hai mặt cắt của 2 cây nhằm tạo thuận lợi cho sự di chuyển của virus từ cây bệnh sang cây lành. Dùng bình xịt phun sương lên toàn bộ cây sau khi ghép và chụp lồng cách li côn trùng. Theo dõi biểu hiện bệnh trong thời gian 60 ngày.

Các chỉ tiêu đánh giá mức độ biểu hiện bệnh

Xác định các mức độ biểu hiện bệnh theo tiêu

chí Lapidot và Friedmann đưa ra năm 2002. Theo các tác giả, biểu hiện bệnh xoắn vàng là do TYLCV được chia làm 4 mức độ từ 0 đến 4 (kí hiệu từ S0 đến S4) (Hình 1).

Phân tích sự phân li gen chuyển ở thế hệ T1 bằng chỉ thị kháng kháng sinh Km

Hạt cây T0 sau khi phơi khô được gieo trong chậu thí nghiệm cho nảy mầm. Cây con 3 ngày tuổi được phun kháng sinh Km nồng độ 100 mg/l. Tiến hành phun 3 lần với thời gian cách nhau 5 ngày. Trước mỗi lần phun kháng sinh không tưới trong khoảng 2 - 3 ngày. Tỷ lệ phân ly cây T1 được tính bằng số cây kháng Km/số cây không kháng Km.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Tạo cây cà chua chuyển gen mang cấu trúc RNAi/pGWTLGV-C_{1,2}+CP₂

Với 546 mảnh lá mầm lấy nhiễm vi khuẩn mang cấu trúc RNAi/pGWTLGV-C_{1,2}+CP₂ trong 3 lô thí nghiệm, sau các giai đoạn nuôi cấy và chọn lọc thu được 23 dòng cà chua T0 sống sót và ra rễ trên môi trường nuôi cấy có bổ sung kháng sinh Km 50 mg/l (Bảng 1). Các dòng cà chua chuyển gen được nhân vô tính để đảm bảo số lượng cây cần thiết cho phân tích tính kháng virus. Cây con T0 trên môi trường ra rễ 2 tuần được ra bầu bầu cát hoặc ra trực tiếp bầu đất. Kết quả cho thấy trung bình 20 cây ra bầu bầu cát thì có 18 cây sống sót. Tỷ lệ sống sót của cây con khi ra trực tiếp bầu đất thấp hơn trung bình khoảng 15/20 cây. Tuy nhiên các cây ra bầu đất có biểu hiện xanh tốt và mập mạp hơn đồng thời khi trồng trong vườn ươm phục hồi và lớn nhanh hơn so với cây ra bầu bầu cát.

Bảng 1. Kết quả biến nạp cấu trúc RNAi/pGWTLGV-C_{1,2}+CP₂ vào cà chua PT18.

Lô thí nghiệm	Số mảnh lá biến nạp	Số cụm chồi hình thành	Số chồi sống sót /C+Km	Số cây ra rễ /B + Km
1	104	83	27	5
2	142	87	48	4
3	300	270	93	14
Tổng số	546	440	168	23

Ghi chú: B. môi trường ra rễ, C. môi trường tái sinh; nồng độ Km là 50 mg/l.

Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong các dòng cà chua bằng kỹ thuật PCR

DNA tổng số được tách chiết từ các mẫu lá cà chua có tỷ số OD_{260nm}/OD_{280nm} nằm trong khoảng 1,8 – 2,0 đảm bảo chất lượng cho phản ứng nhân gen tiếp theo. Thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi dùng trong thiết kế vector để kiểm tra sự có mặt của đoạn gen cần chuyển trong 23 dòng tái sinh có khả năng kháng Km. Kết quả điện di cho thấy có 2 dòng (số 9, 17) không thu được sản phẩm PCR, còn lại 21 dòng đều nhận được một băng duy nhất với kích thước khoảng 600 bp phù hợp với kích thước của đoạn gen ghép nối giữa CI và CP đã được thiết kế trong cấu trúc RNAi/pGWTLCV-C₁₂+CP₂ để chuyển vào các dòng cà chua. Điều này cho thấy cấu trúc RNAi mang đoạn ghép nối gen CP và gen CI đã được chuyển thành công vào cà chua PT18. Vì vậy, các thí nghiệm trong phân tích cây chuyển gen cần phải tiến hành để kiểm tra sự biểu hiện gen trong cây chuyển gen.

Tính kháng virus của các dòng cà chua chuyển gen thế hệ T0

Phương pháp thử tính kháng của cây chuyển gen với TYLCV thường được sử dụng nhất là thông qua

môi giới. Tuy nhiên phương pháp này thường khó khăn do không chủ động được nguồn bệnh. Chúng tôi sử dụng đồng thời hai phương pháp để lây nhiễm virus là thông qua nguồn bọ phấn từ nhiên trong vườn thí nghiệm với mật độ bọ phấn cao và thông qua vết thương (ghép lại) để đánh giá tính kháng của 21 dòng cà chua LCPI chuyển cấu trúc gen RNAi/pGWTLCV-C₁₂+CP₂ và đối chứng WT như đã mô tả.

Qua theo dõi số lượt bọ phấn chích hút ở các dòng cà chua chuyển gen và đối chứng thấy hầu hết những lần theo dõi đều xuất hiện có bọ phấn chích trên các cây cần đánh giá với số lượng tương đối đồng đều khoảng 5 – 7 con/cây/lượt quan sát. Sau 40 ngày theo dõi biểu hiện bệnh sau lây nhiễm bọ phấn cho 21 dòng cà chua chuyển gen T0 thu được 4 dòng có biểu hiện kháng hoàn toàn với TYLCVV (các dòng LCPI-2, LCPI-4, LCPI-8 và LCPI-16) và 17 dòng nhiễm bệnh xoắn vàng lá với các mức độ biểu hiện khác nhau (Bảng 1). Tuy nhiên so với đối chứng các dòng này có biểu hiện bệnh chậm hơn và mức độ chuyển bệnh cũng lâu hơn khá nhiều. Cụ thể, sau 20 ngày lây nhiễm TYLCVV các dòng chuyển gen mới biểu hiện bệnh ở mức độ S1 (chậm hơn đối chứng 10 ngày) với tỷ lệ nhiễm là 12/21 dòng và hầu hết đều chuyển lên các mức bệnh nặng hơn sau 10 ngày (đối chứng là 5 đến 7 ngày).

Bảng 2. Mức độ biểu hiện bệnh của 21 dòng cà chua chuyển gen LCPI1 thế hệ T0 và đối chứng sau lây nhiễm TYLCVV

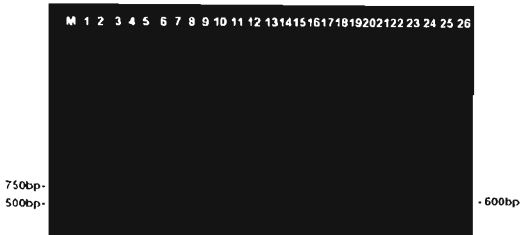
Dòng cây	Mức độ nhiễm bệnh	Số cây biểu hiện bệnh sau lây nhiễm TYLCVV				Tổng dòng biểu hiện bệnh sau đánh giá
		10 ngày	20 ngày	30 ngày	40 ngày	
LCP1	S0	105	79	50	46	4
	S1	0	26	39	13	5
	S2	0	0	16	29	9
	S3	0	0	0	17	3
	S4	0	0	0	0	0
WT	S0	2	0	0	0	0
	S1	8	1	0	0	0
	S2	0	5	0	0	0
	S3	0	4	1	0	0
	S4	0	0	9	10	10

Ghi chú: Mỗi dòng LCPI1 lây nhiễm 5 cây. Kết quả cuối cùng thu được 4 dòng kháng hoàn toàn, 5 dòng biểu hiện bệnh mức độ 1; 9 dòng biểu hiện bệnh mức 2 và 3 dòng biểu hiện bệnh ở mức 3 sau 40 ngày theo dõi.



S0: Cây không nhiễm bệnh, sinh trưởng và phát triển bình thường
 S1: Những lá trên đỉnh ngọn có biểu hiện vàng nhẹ ở mép lá
 S2: Lá vàng và xoăn nhẹ ở mép lá
 S3: Lá vàng, xoăn và cup xuống đồng thời kích thước bị thu nhỏ lại
 S4: Lá xoăn, kích thước lá thu nhỏ nhiều, cây cằn cỗi và ngưng sinh trưởng

Hình 1. Các mức độ biểu hiện bệnh xoăn vàng lá cà chua do nhiễm TYLCV (Theo Lapidot, Friedmann, 2002)



Hình 2. Sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt của cấu trúc gen CP+C1 trong các dòng cà chua chuyển gen. M: Macker 1 kb, 1: Đối chứng âm (nước), 2: Đối chứng dương (plasmid mang gen chuyển), 3: Cây WT, 4-26: Các dòng cà chua chuyển gen



Hình 3. Dòng LCP1-4. (Hình bên trái) biểu hiện tình kháng bệnh sau 60 ngày theo dõi so với đối chứng (Hình bên phải) bằng phương pháp lây nhiễm bọ phấn tự nhiên.

Đối với hình thức lây nhiễm nguồn bệnh qua vết thương bằng ghép, chúng tôi cũng thu được 4 dòng

kháng hoàn toàn với TYLCVV như trên. Phương pháp này có ưu điểm là khả năng lây nhiễm nguồn bệnh khá đồng đều giữa các dòng cần đánh giá. Tuy nhiên khi sử dụng phương pháp này, biểu hiện bệnh xuất hiện muộn hơn khá nhiều. Đối chứng biểu hiện bệnh sau 20 ngày ghép, các dòng chuyển gen bắt đầu biểu hiện bệnh sau 30 ngày, có dòng 40 ngày mới biểu hiện bệnh. Nhược điểm chính khi sử dụng phương pháp này rất tốn công sức và đòi hỏi kỹ thuật ghép để thành công.

Chúng tôi nhận thấy, trong số 4 dòng kháng hoàn toàn, dòng LCP1-8 có biểu hiện bệnh nhẹ mức độ S1 sau 30 ngày lây nhiễm bọ phấn. Tuy nhiên, bệnh chỉ biểu hiện trong khoảng 10 ngày sau đó không còn nữa, các lá non mới ra lại có kiểu hình bình thường như cây không bị bệnh. Điều này có thể giải thích do cấu trúc RNAi được chuyển vào vẫn hoạt động nhưng không ổn định hoặc do cây còn nhỏ nên khả năng kháng bệnh kém hơn, khi cây lớn và khỏe thì khả năng kháng được hoàn toàn.

Đặc biệt, dòng LCPI-2 tuy có biểu hiện kháng hoàn toàn nhưng kiểu hình dòng này có sự thay đổi, các quả đều ra ở đỉnh ngọn của cây và kích thước quả rất nhỏ tương đương với kích thước quả cà chua bi. Điều này có thể do vị trí gen chuyển đã làm ảnh hưởng đến một số gen liên quan đến biểu hiện kiểu hình của cây.

Phân tích sự phân li gen chuyển và đặc điểm kháng TYLCVV thế hệ T1

Lựa chọn những dòng có khả năng kháng cao với TYLCVV ở thế hệ T0 để phân tích sự phân li gen chuyển dựa vào chỉ thị kháng kháng sinh Km như đã trình bày. Kết quả cho thấy, trong tổng số 4 dòng T0 kháng hoàn toàn với TYLCVV có 2 dòng cho tỷ lệ phân li T1 là 3:1 theo định luật của Mendel, đó là các dòng LCPI-4 và LCPI-16 (Bảng 2).

Kết quả phân tích 43 cây T1 kháng Km thu được từ hạt T0 của dòng LCPI-4 có 17 cây kháng hoàn toàn với TYLCVV sau 60 ngày theo dõi. Số cây còn lại biểu hiện tính kháng kém hơn, đa số sau khi các cây này ra hoa thì có biểu hiện nhiễm bệnh nhẹ từ mức độ S1 đến S3. Theo suy đoán của chúng tôi, rất có thể những cây có biểu hiện kháng cao ở thế hệ T1 là những cây mang dòng hợp tử về gen chuyển và các gen hoạt động hiệu quả hơn. Để có kết quả chính xác cần tiến hành phân tích những dòng này ở thế hệ tiếp theo.

Hiệu quả kháng virus bằng kỹ thuật RNAi ở thực vật lần đầu tiên được chứng minh với công trình của Waterhouse và đồng tác giả (1998) khi sử dụng gen mã hóa protein xử lý sau dịch mã HC-pro của virus Y khoai tây để kháng lại chính virus này.

Ngay sau đó kỹ thuật này đã được ứng dụng và tạo ra nhiều giống cây trồng kháng virus (Kalanitidis *et al.*, 2002; Missiou *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2000). Các nghiên cứu chủ yếu tập trung nhằm bất hoạt các gen mã hóa protein chính của virus khi sử dụng những cấu trúc RNAi có chứa trình tự gen virus lặp lại đảo chiều (hairpin RNA, hpRNA). Năm 2000, Smith và đồng tác giả đã nhận thấy cấu trúc kẹp tóc hpRNA có đoạn intron (ihpRNA) nằm giữa hai đoạn lặp lại đảo chiều có hiệu quả bất hoạt gen sau phiên mã ở những cây chuyển gen lên đến 100%, trong khi cấu trúc hpRNA không có intron chỉ cho hiệu quả tương ứng là 69%. Sau này, nhiều nghiên cứu cũng đã chứng minh tính hiệu quả cao của cấu trúc ihpRNA có nguồn gốc gen virus gây bệnh đối với việc tạo cây chuyển gen kháng lại chính virus đó (Bonfim *et al.*, 2007). TYLCV là virus DNA nên hiệu quả bất hoạt gen thông qua RNAi đối với loại virus này thường khó khăn hơn do sự bất hoạt không xảy ra hoàn toàn. Tuy nhiên, các công trình chuyển gen kháng TYLCV vào cà chua khi sử dụng đơn đoạn gen của chúng đã được công bố (Abhary *et al.*, 2006; Asad *et al.*, 2003; Fuentes *et al.*, 2006). Bên cạnh đó, những phát hiện chứng minh sự kim hãm cơ chế RNAi của các protein được mã hóa bởi các gen còn lại chưa bị bất hoạt trong hệ gen virus cũng đã được đưa ra (Avi *et al.*, 2007; Kon *et al.*, 2007; Trinks *et al.*, 2005; Vanitharani *et al.*, 2004). Cấu trúc gen RNAi/pGWTLCV-C_{1,2}+CP₂ được chuyển vào cà chua có khả năng bất hoạt đồng thời hai gen quan trọng của TYLCV đã thu được kết quả bước đầu khá quan trọng. Để tăng cường hiệu quả kháng và duy trì tính kháng ổn định, lâu dài thì sự bất hoạt đồng thời nhiều gen chức năng của virus cần phải được tiến hành.

Bảng 3. Sự phân li gen chuyển và tính kháng TYLCVV của một số dòng LCPI thế hệ T1

Dòng	Tính kháng Km					Tính kháng TYLCVV						
	Hạt	Kháng Km	không kháng	Tỷ lệ	χ^2	Cây	S0	S1	S2	S3	S4	Tỷ lệ %
LCPI-4	142	102	36	3 : 1	0.087	43	17	12	9	5	0	39
LCPI-8	54	54	0			30						
LCPI-16	89	66	23	3 : 1	0.034	27	-	-	-	-	-	-

Ghi chú: (-) không xác định hoặc chưa tiến hành phân tích. Những giá trị χ^2 bé hơn 3,84 ($-p=0.05$) thì giá trị quan sát phù hợp với giá trị tính toán dưới định luật Mendel (<http://www2.lv.psu.edu/~jxm57/rp/chisqr.html>)

KẾT LUẬN

Sử dụng vector chuyển gen cấu trúc RNAi mang đoạn nối giữa hai gen CP và CI của TYLCVV để chuyển vào giống cà chua PT18 đã thu được 21 dòng

cho kết quả dương tính với phản ứng PCR kiểm tra sự có mặt của gen chuyển. Sử dụng 2 phương pháp lây nhiễm bộ phận tự nhiên và ghép áp với cây bệnh trong đánh giá tính kháng TYLCVV cho thấy có 4/21 dòng cà chua chuyển gen thế hệ T0 có khả năng

kháng hoàn toàn với virus TYLCVV gây bệnh xoắn lá cà chua (chiếm 19 %).

Có 2 trong 4 dòng T0 kháng TYLCVV cho tỷ lệ phân li gen chuyển là 3 : 1. Tỷ lệ kháng hoàn toàn với TYLCVV của dòng LCP1-4 ở thế hệ T1 là 17/43 cây chiếm 39 %

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được hoàn thành dưới sự tài trợ kinh phí của đề tài cấp Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam "Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật RNAi trong tạo giống cây trồng kháng bệnh virus". Một phần nghiên cứu được thực hiện trên trang thí nghiệm của Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abhary MK, Anfoka GH, Nakhla MK, Maxwell DP (2006) Post-transcriptional gene silencing in controlling viruses of the tomato yellow leaf curl virus complex. *Arch Virol* 151: 2349-2363.
- Asad S, Haris WAA, Bashir A, Zafar Y, Malik KA, Malik NN, Lichtenstein CP (2003) Transgenic tobacco expressing geminiviral RNAs are resistant to the serious viral pathogen causing cotton leaf curl disease. *Arch Virol* 148: 2341-2352.
- Avi Z, Efrat G, Levy Y, Arazi T, Citovsky V, Gafni Y (2007) Suppressor of RNA silencing encoded by Tomato yellow leaf curl virus-Israel. *Virology* 358: 159-165.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 295-296.
- Bonfim K, Faria JC, Nogueira EOPL, Mendes EA, Aragao FJL (2007) RNAi-mediated resistance to Bean golden mosaic virus in genetically engineered common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Mol Plant Microbe Interact* 20(6): 717-726.
- Chowda RV, Colvin J, Muniyapa V, Seal S (2005) Diversity and distribution of begomoviruses infecting tomato in India. *Arch Virol* 150: 845-867.
- Collins GG, Symons RH (1992) Extraction of nuclear DNA from grape vine leaves by modified procedure *Plant Mol Bio Rept* 10: 233-235
- Đỗ Xuân Đồng, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình (2007) Nghiên cứu quy trình tái sinh và hệ thống chuyển gen cho một số giống cà chua (*Lycopersicon esculentum* L.) của Việt Nam. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5(2): 217-223.
- Fuentes A, Ramos PL, Fiallo E, Callard D, Sánchez Y, Peral R, Rodríguez R, Pujol M (2006) Intron-hairpin RNA derived from replication associated protein C1 gene confers immunity to Tomato yellow leaf curl virus infection in transgenic tomato plants. *Transgenic Res* 15: 291-304.
- Ha C, Coombs S, Revill P, Harding R, Vu M, Dale J (2008) Molecular characterization of Begomoviruses and DNA satellites from Vietnam: additional evidence that the New World Geminiviruses were present in the Old World prior to continental separation. *J Gen Virol* 89: 313-326
- Hamilton JH, Baulcombe DC (1999) A species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952.
- Idris AM, Brown JK (2005) Evidence for interspecific-recombination for three monopartite begomoviral genomes associated with the tomato leaf curl disease from central Sudan. *Arch Virol* 150: 1003-1012
- Kalantidis K, Psaradakis S, Tabler M and Tsagris M (2002) The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 826-833.
- Kon T, Hidayat SH, Hase S, Takahashi H, Ikegami M (2006) The natural occurrence of two distinct begomoviruses associated with DNAβ and a recombinant DNA in a tomato plant from Indonesia. *Phytopathology* 96: 517-525.
- Lapidot M, Friedmann M (2002) Breeding for resistance to whitefly - transmitted geminivirus. *Ann Appl Biol* 140: 109-127
- Missiou A, Kalantidis K, Boulla A, Tzortzakaki S, Tabler M and Tsagris M (2004) Generation of transgenic potato plants highly resistant to potato virus Y (PVY) through RNA silencing. *Mol Breed* 14: 185-197.
- Navot N, Pichersky E, Zeidan M, Zamir D, Czosnek H (1991), Tomato yellow leaf curl virus: a whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. *Virology* 185: 131-161.
- Nguyễn Thị Hải Yến, Phạm Thị Vân, Chu Hoàng Hà, Chu Hoàng Mậu, Lê Trần Bình (2009) Thiết kế vector chuyển gen mang cấu trúc RNAi có khả năng kháng virus gây bệnh xoắn lá ở cà chua. *Báo cáo Hội nghị toàn quốc về Công nghệ sinh học*: 544-549.
- Pico B, Díez MJ, Nuez F (1996) Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. "The Tomato yellow leaf curl virus"- a review. *Sci Hortic* 67: 151-196.
- Trinks D, Rajeswaran R, Shivaprasad PV, Akbergenov R, Oakley EJ, Veluthambi K, Hohn T, Pooggin M (2005) Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J Virol* 79: 2517-2527

Vanitharani R, Chellappan P, Pita JS, Fauquet CM (2004) Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* 78: 9487-9498.

Wang MB, Abbott DC and Waterhouse PM (2000) A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. *Mol Plant Pathol* 1: 347-356.

DEVELOPMENT OF TOMATO PT18 PLANTS RESISTANT TO TOMATO YELLOW LEAF CURL VIRUS BY RNAI TECHNOLOGY

Nguyễn Thị Hải Yến^{1,2}, Phạm Thị Vân¹, Chu Hoàng Hà², Chu Hoàng Mậu¹, Lê Trần Bình^{2,*}

¹Thai Nguyen University

²Institute of Biotechnology

SUMMARY

Tomato Yellow Leaf Curl Virus (TYLCV) is one of the main causes to decrease productivity and quality of solanaceae. The most effective method to prevent TYLCV is the use of resistant varieties. Recently, RNAi technology is a new trend in creating virus-resistant plants at many laboratories. We obtained some significant achievements by generating these kinds of plant. In this report, the RNAi/pGWTLVCV-C1.2+CP2 construct containing Vietnam TYLCV CP and C1 genes under controlling of CaMV35S was transformed into tomato plants (cv. PT18) via *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation. Five hundred and forty six pieces of leaf were infected with *A. tumefaciens* carrying this transgene structure. After regeneration and selection we obtained 23 lines of transgenic plants resistant to 50 mg/l kanamycin. Analysing the presence of transgenes in kanamycine-resistant plants by PCR with specific primers, we obtained 21/23 positive lines. Virus resistant rate of 21 transgenic lines were tested by grafting and artificial virus infecting that uses *Bemisia tabaci* as transmission vector. The result showed that the 4/21 (19%) transgenic lines including LCPI-2, LCPI-4, LCPI-8 and LCPI-16 are fully resistant to TYLCV. Segregation analysis by kanamycin resistance of these 4 lines in T1 progenies showed that two of them (LCPI-4 and LCPI-16) had segregation ratio 3:1 as Mendelian's inheritance. In T1 progenies of LCPI-4 line, TYCLV resistant ratio is 17/43 (39%).

Keywords: Tomato PT18, transformation, RNA interference, Tomato Yellow Leaf Curl Viet Nam Virus

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37364691; Fax: 84-4-38363144; E-mail: binh@ibt.ac.vn